Aus dem Hygienischen Institut Basel. Vorsteher: Prof. R. Doerr

Serumglobulin und Serumalbumin als Anaphylaktogene

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Hohen medizinischen Fakultät der Universität Basel

vorgelegt von

Eduard Stern
von Biel (Kanton Bern)

Druck von R. Oldenbourg, München

1922

Aus dem Hygienischen Institut Basel. Vorsteher: Prof. R. Doerr

Serumglobulin und Serumalbumin als Anaphylaktogene

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Hohen medizinischen Fakultät der Universität Basel

vorgelegt von

Eduard Stern
von Biel (Kanton Bern)

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Druck von R. Oldenbourg, München

Von der medizinischen Fakultät Basel genehmigt auf Antrag von Professor Dr. Robert Doerr.

Erscheint in „Archiv für Hygiene“ 91. Band. Heft 3 u. 4. 1922.

Wie bekannt, wird das Eiweiß im Serum nicht als einheitlicher Körper angesehen, sondern es werden nach verschiedenem physikalischen und chemischen Verhalten in der Hauptsache drei Fraktionen unterschieden, das Euglobulin, das Pseudoglobulin und das Albumin, wozu meist noch Spuren von Fibringlobulin kommen, die der Gerinnung entgangen sind.

Von den physikalisch-chemischen Unterscheidungsmerkmalen wird in erster Linie das Verhalten der Eiweißlösungen gegen Elektrolyte (Fällbarkeit und Löslichkeit) zur Trennung und Einteilung herangezogen. Die nur bei Gegenwart von Elektrolyten lösliche, bei Verdünnung des Serums mit destilliertem Wasser und bei Entfernung der Elektrolyte durch Dialyse ausfallende Fraktion des Serums, wird als Euglobulin bezeichnet. Pseudoglobulin und Albumin dagegen sind in destilliertem Wasser löslich. Sämtliche Einweißfraktionen des Serums sind durch Neutralsalze aus ihren Lösungen fällbar, können aber durch verschiedene Konzentration der fällenden Salze bis zu einem gewissen Grade voneinander getrennt werden. Letztere Tatsache hat verschiedene Aussalzungsverfahren gezeitigt, z. B. die Ausfällmethode durch Ganzsättigung mit Magnesiumsulfat (Denis, Hammarsten, Burckhardt), das Verfahren nach Hofmeister, Kauder und Pohl durch Fraktionierung mit Ammoniumsulfat und die fraktionierte Fällung mit Natriumsulfat oder Kaliumazetat nach Spiro und Porges, Fuld und Spiro. Nach dem zweiten Verfahren wird bei ⅓-Sättigung mit Ammoniumsulfat das Euglobulin, bei ½-Sättigung das Pseudoglobulin und bei Ganzsättigung Albumin erhalten.

Es wurde auch versucht, durch Elementaranalyse Unterschiede in der chemischen Konstitution der Fraktionen zu ermitteln. Mörner z. B. schrieb dem Albumin einen höheren Cystin- bzw. Schwefelgehalt zu. Die Globuline sollen sich von den Albuminen unterscheiden dadurch, daß sie bei der hydrolytischen Spaltung Glykokoll liefern. Die Bewertung dieser Untersuchungen ist jedoch dadurch erschwert, daß die Serumeiweißkörper nicht in streng chemischem Sinne frei von Beimengungen dargestellt werden können, und es werden daher vielfach scharfe Grenzen zwischen den Fraktionen überhaupt geleugnet und fließende Übergänge angenommen Ja, einzelne Autoren (Moll) haben sogar durch Erhitzen von Serum und von Albuminlösungen eine Vermehrung der bei ½-Sättigung mit Ammoniumsulfat ausfällenden Eiweißkörper erzielt. Hammarsten bezweifelte nun, daß es sich dabei um einen wahren Übergang von Albumin in Globulin

handelt, da aus glykokollfreiem Albumin nicht glykokollhaltiges Globulin hervorgehen könne, während Breinl die Vermutung aussprach, daß bei der unter Schwefelabspaltung sich vollziehenden Umwandlung von Albumin in Globulin ein Teil des im Albumin enthaltenen Cystins sich in Glykokoll umsetzen könne. Moll hat nun geglaubt, die Überführung des Albumins in echtes Globulin auch durch Immunitätsreaktionen nachweisen zu können, indem er angab, daß das Serum der mit subkutanen Injektionen von künstlichem Globulin ebenso wie der mit natürlichem Globulin behandelten Kaninchen einen stärkeren Niederschlag mit Globulin als mit Albumin gab. Die Prüfung mit der Präzipitation ist jedoch für diese Frage nicht ganz beweisend und Obermeyer und Pick, Landsteiner und Calvo ist es nicht gelungen, die Eiweißarten des Pferdeserums durch die Praezipitinreaktion zu trennen. Doerr und Berger konnten neuerdings bei Prüfung der künstlichen „Globulinvermehrung" durch Sensibilisierung von Meerschweinchen keine gesteigerte sensibilisierende Kraft nachweisen. —

Das Globulin ist von den Eiweißfraktionen des Serums die am wenigsten stabile Fraktion. Nicht nur, daß es bei den angeführten Aussalzungsmethoden schon bei der geringen Salzkonzentration ausfällt, sondern es genügen schon mechanische Eingriffe, wie kräftiges, langdauerndes Schütteln, um das Globulin aus dem Sol- in den Gelzustand überzuführen.

In neuerer Zeit sind einige weitere Unterschiede zwischen Albumin und Globulin ermittelt worden, speziell colloid-chemischer und physikalischer Natur. Die Verschiedenheiten in der Dispersion der Globulin- und der Albuminfraktionen ließen sich durch Ultrafiltration mit Filtern von verschiedener Dichte nachweisen, indem das Globulin weniger dispers ist als das Albumin, das kleinere Partikelchen besitzt (Henseval).

Auch das Verhalten der Viskosität ist bei Globulin und Albumin verschieden, indem Globulin bei gleicher Menge eine höhere Viskosität besitzt als eine gleichkonzentrierte Albuminlösung (Rohrer, Chick und Lubrzcynska).

Durch Prüfung der sensibilisierenden und der schockauslösenden Wirkung der Eiweißkörper am Meerschweinchen ist auch die biologische Methode der Eiweißuntersuchung zur Differenzierung der einzelnen Fraktionen im Serum herangezogen worden, was eine um so wertvollere Bereicherung der Methodik bedeutet, als die angewandten physikalisch-chemischen Trennungsmethoden keine definitive Klärung gebracht haben und da in dieser Methodik ein besonders feines Reagens für Eiweißkörper zur Verfügung zu stehen schien. Da es sich hier außer der Feststellung der Verwendbarkeit von Globulin und Albuminlösungen bzw. verschieden zusammengesetzter Sera, im Laboratoriumsexperiment, auch um eine Frage handelt, die das Problem der Eiweißdifferenzierung überhaupt betrifft, so rechtfertigt sich das Interesse, das diesen Versuchen entgegengebracht wird.

Auf die praktische Bedeutung solcher Untersuchungen, denen die Sensibilisierung nicht nur mit Vollserum, sondern mit den verschiedenen Eiweißfraktionen desselben zugrunde liegen, wies auch das Verhalten der Serumkrankheit beim Menschen hin, wonach beobachtet wurde, daß auf eine einzige Injektion von Serum zwei, ja, nach Goodall und Axenow sogar 3 bis 4 Schübe von Serumexanthem auftreten, eine Erscheinung, die man mit der Existenz und dem verschiedenen antigenen Verhalten obiger Eiweißkörper im Serum in Beziehung gebracht hat.

Die ersten Versuche, welche die Rolle der verschiedenen Eiweißkörper im Serum in Hinsucht auf die Überempfindlichkeit oder Anaphylaxie gegen artfremdes Serum zu ergründen suchten, stammen von Gay und Adler und datieren aus dem Jahre 1908. Die Autoren fanden eine zu-

nehmende Abnahme des Sensibilisierungsvermögens und eine Zunahme der von ihnen sogenannten „Toxizität“ in dem Maße, wie die Menge des zur Fällung notwendigen Ammoniumsulfates wuchs. Das Euglobulin wirkte am stärksten sensibilisierend und am wenigsten „toxisch“, das Albumin verhielt sich gerade umgekehrt.

Doerr und Ruß haben diese Frage im Jahre 1909 neuerlich experimentell geprüft. Sie arbeiteten ebenfalls mit Meerschweinchen, welche Tiere sich zum Studium der Anaphylaxie am besten eignen, und gewannen die einzelnen Bestandteile des Pferdeserums durch fraktioniertes Ausfällen mit Ammoniumsulfat nach dem Verfahren von Hofmeister. Da, wie sich später zeigen wird, die Herstellungsweise der zu solchen Versuchen verwendeten Eiweißfraktionen von ausschlaggebender Bedeutung sein dürfte, sei die von Doerr und Ruß angegebene Technik eingehend wiedergegeben.

Bei ein und derselben Serumquantität wurde die bei ⅓-, ½-, ⅔- und Ganzsättigung ausfallende Fraktion hergestellt. Jede derselben wurde abfiltriert durch Baryumfilter, dieses mit dem Niederschlag in etwas destilliertem Wasser aufgenommen und durch Pergament gegen fließendes Leitungswasser 24 Stunden dialysiert. Der Dialyseninhalt wurde koliert, sodann wieder gefällt, und zwar die ⅓-Fraktion wieder mit ⅓-Sättigung, die anderen Fraktionen dementsprechend. Die neuen Niederschläge wurden wieder filtriert, gelöst, 48 Stunden dialysiert, dann koliert, auf das Ausgangsvolumen aufgefüllt und durch Reichelfilter filtriert. Die kleinere Albuminfraktion, die zwischen ½- und ⅔-Sättigung fällbar ist, wurde dabei weggenommen und nur das Albumin verwendet, welches zwischen ⅔- und Ganzsättigung ausfällt. Die so dargestellte Albuminfraktion ist also verläßlich rein, d. h. frei von eventuellen Spuren von Pseudoglobulin und von den nicht ammoniumsulfatfällbaren Substanzen des Serums. —

Die auf obige Weise erhaltenen Lösungen wurden nun im Gegensatz zu den gleich zu besprechenden Versuchen von Dale und Hartley am ganzen Tier geprüft: „1. auf ihr Sensibilisierungsvermögen, indem die Tiere fallende Mengen (entsprechend 0,01—0,0001 Serum) derselben subkutan erhielten und nach 10, 20, 30 Tagen durch intravenöse Injektionen von 0,2 Vollserum auf Anaphylaxie untersucht wurden“; 2. auf die Toxizität, indem Reihen von mit 0,01 Vollserum subkutan vorbehandelten Tieren am Beginn des 14. Tages fallende Mengen der einzelnen Fraktionen intravenös erhielten“; 3. auf das Immunisierungsvermögen, indem die nach 2. überlebenden Tiere am nächsten Tag in die zweite Jugularis 0,2 Vollserum erhielten (Antianaphylaxie).

Die Zusammenfassung der Versuchsresultate von Doerr und Ruß zeigte nun folgendes:

1. Der Grad der Überempfindlichkeit gegen artfremdes Serum kann beim Meerschweinchen gemessen werden durch die Menge des zur Auslösung der Symptome notwendigen intravenös reinjizierten Serums.

2. Derselbe ist abhängig von der zur Sensibilisierung benützten Serumquantität und von dem zwischen beiden Injektionen liegenden Intervall.

3. Die anaphylaktisierende Substanz des Serums ist identisch mit jenem Körper, der bei der Reinjektion toxisch wirkt.

4. Durch Aussalzen mit Ammoniumsulfat kann gezeigt werden, daß sowohl die sensibilisierenden als „toxischen“ Eigenschaften beim Rinderserum und Pferdeserum an den Globulinen haftet, während die Albumine gar nicht aktiv sind oder nur in so verschwindendem Maße, daß dies aus der Unreinheit der Albuminfraktionen erklärt werden kann.

5. In der anaphylaktischen Reaktion bietet sich somit die Möglichkeit, die verschiedenen Eiweißkörper des Serums voneinander zu differenzieren.

Doerr und Ruß fanden also, daß die sensibilisierende Kraft und die Toxizität für das präparierte Tier indirekt proportional waren der Menge Ammoniumsulfat, welche zur Fällung nötig war. Euglobulin war am stärksten anaphylaktisch

aktiv, das Albumin überhaupt nicht oder nur äußerst schwach, während das Pseudoglobulin sich in der Mitte hielt. In späteren Versuchen, welche am Kaninchen vorgenommen wurden, kamen Doerr und Ruß zu denselben Ergebnissen. Danach wäre also jedes artfremde Serum als einheitliches, nur durch ein Globulin wirkendes Antigen zu betrachten.

Die Versuche von Doerr und Ruß gaben den Anstoß zur weiteren Verfolgung dieses Problems. Dale und Hartley haben im Jahre 1916 mitgeteilt, daß sie auf Grund ihrer Versuche zu einem anderen Resultat gelangt wären als Doerr und Ruß. In Anbetracht der Wichtigkeit der angewandten Technik für den Vergleich der Versuchsresultate von Doerr und Ruß und Dale und Harltey müssen auch die Angaben von Dale und Hartley bezüglich der Technik der Darstellung der von ihnen verwendeten Serumeiweiße wörtlich (in der Übersetzung aus dem Englischen) angegeben werden. Dale und Hartley schreiben: „Diejenigen Proteine, die wir in der Mehrzahl unserer Experimente benützten, waren von einem von uns für eine chemische Untersuchung hergestellt worden und wurden die Resultate derselben bereits publiziert, zusammen mit den Einzelheiten der Darstellungsmethode (Hartley 1914). Das Euglobulin, welches benützt wurde, war dasjenige, das nach der Methode von Panum hergestellt wurde und welches eine größere Annäherung an völlige Reinheit von den anderen Proteinen aufwies als die Proben von Pseudoglobulin und Albumin, obwohl diese wahrscheinlich so rein waren, als wiederholtes Aussalzen sie überhaupt machen konnte. Eine nachträgliche Probe von Pseudoglobulin aus Pferdeserum wurde mir in freundlicher Weise von Dr. H. Chick zur Verfügung gestellt, welche es nach der üblichen Trennung mit Ammonsulfat weiter reinigte, durch fortlaufendes Dialysieren während einiger Monate, wodurch Überbleibsel des Euglobulins aus der Lösung entfernt wurden. Beide Proben von Pseudoglobulin waren „euglobulinfrei“ in dem Sinne, daß die gebräuchlichsten Methoden des Nachweises und der Trennung kein Euglobulin in ihnen entdeckt haben würden. Aber es wurde gezeigt, daß die Menge eines Proteins, welche für die Sensibilisierung eines Meerschweinchens nötig ist, so winzig ist, daß nicht ohne weiteres als sicher angenommen werden kann, daß sie frei von solchen Spuren von Euglobulin sei, welche wahrnehmbar in dieser Richtung wirksam sein könnten. In Ergänzung der oben erwähnten Proben wurde in mehreren Versuchen eine Albuminprobe benützt, welche auf andere Weise hergestellt wurde. Dieses war ein kristallisiertes Albumin, hergestellt nach der Methode von Pinkus u. Hopkins (1898), dreimal auskristallisiert, wobei nur diejenige Fraktion aus jedem Ergebnis genommen wurde, welche völlig aus großen schönen Kristallen bestand. Dieses wurde von Ammonsulfat frei dialysiert und im Vakuum zu Lamellen getrocknet. Ein Teil davon wurde, zu einem anderen Zweck, in Wasser aufgelöst, gefällt mit kaltem Azeton und Äther, drei Tage lang mit warmem Äther extrahiert und endlich in Wasser aufgenommen und rekristallisiert, was besonders schön gebildete Kristalle ergab. Diese wurden wieder dialysiert und trocken gehalten. Keines dieser Präparate zeigte irgend eine bemerkenswerte Differenz in der Wirkung, als die Albuminfraktionen, welche auf dem gewöhnlichen Wege des Aussalzens gewonnen wurden.“

Im Gegensatz zu Doerr und Ruß nahmen Dale und Hartley die Versuche nicht am lebenden Tier vor, sondern am flach ausgespannten Uterus, dessen beide Hörner sie 12—31 Tage nach der mit Vollserum oder einer Lösung der getrennten Proteinpräparate erfolgten Präparierung der Tiere auf ihre Überempfindlichkeit gegen die einzelnen Serumproteine prüften. Die beiden Autoren fanden nun, nachdem sie die Meerschweinchen mit 0,1 ccm Vollserum präpariert hatten, daß der Uterus der Tiere prompt und ausgesprochen auf Euglobulin und Pseudoglobulin reagierte und ein Maximum der Reaktion zeigte zwischen dem 14. und 21. Tage nach der Sensibilisierung. Versuche, die zu gleicher Zeit am Uterus mit Albumin vorgenommen wurden, schienen die Anschauungen von Doerr und Ruß zunächst zu bestätigen, indem Dosen von 5 oder 10 mg Albumin keine Wirkung hervorriefen, während 1 mg Euglobulin sofort eine kräftige Reaktion erzeugte. Einige Zeit später sensibilisierten sie 6 Meerschweinchen mit der gewöhnlichen Dosis von 0,1 Vollserum, und als sie zufälligerweise nach einem längeren Intervall den Uterus mit 1 mg reinem Serumalbumin in Berührung

brachten, beobachteten sie, wie eine sofortige Reaktion eintrat, die eine nahezu maximale Stärke aufwies. Das Intervall, das zwischen der Sensibilisierung und diesem Befund lag, betrug mehr wie 30 Tage. Dale und Hartley bauten daraufhin ihre Versuche weiter aus, indem sie ein Meerschweinchen subkutan mit 0,1 ccm Vollserum sensibilisierten und am 32. Tag 1 ccm Albumin einer 1proz. Lösung (in physiologischer Kochsalzlösung) reinjizierten. Innerhalb 3 Minuten erfolgte der anaphylaktische Tod unter den typischen Erscheinungen der Lungenlähmung und verzögerten Gerinnbarkeit des Blutes. Die Versuche von Dale und Hartley scheinen also mit Sicherheit eine Anaphylaxie gegen Serumalbumin festzustellen, die sich dadurch auszeichnet, daß sie sich sehr viel langsamer entwickelt als jene gegen Euglobulin und daß sie am ausgesprochensten ist, wenn die Überempfindlichkeit gegen letzteres schon in der Abnahme begriffen ist. In ihren weiteren Versuchen sensibilisierten Dale und Hartley ihre Tiere nicht mehr mit Vollserum, sondern mit den getrennten Serumproteinen, und bemerkten nun, daß bei den mit Albumin vorbehandelten Tieren die Überempfindlichkeit gegen Albumin sich noch immer langsam entwickelt, aber doch in einem früheren Zeitpunkt eintritt, als wenn zur Sensibilisierung Vollserum verwendet worden war. Am 10. Tag war keine Albuminüberempfindlichkeit nachweisbar, eine kräftige, mit Exitus endende aber schon am 17. Tag. Die Differenz der Inkubation war also nur ausgeprägt, wenn man zur Sensibilisierung nicht reines Albumin, sondern Vollserum verwandte. Es ist nun die Möglichkeit gegeben, daß die lange Inkubationszeit des Albumins nicht ein absolutes Spezifikum dieses Eiweißkörpers ist, sondern daß diese Inkubationszeit durch Verwendung größerer Dosen Albumin abgekürzt werden kann. Wie Doerr in seinem Übersichtsreferat über Anaphylaxie ausführt, wäre das stärkere Wirksamsein des Euglobulins dahin zu erklären, daß es von Natur aus ein stärkeres Antigen ist als das Albumin. Vergleichende Versuche zwischen Vollserum und Euglobulin zeigten, daß die kleinste Dosis letalis für Vollserum übereinstimmt mit derjenigen des Euglobulins, aus dem Grunde, weil unter diesen Versuchsbedingungen nach Ablauf der ersten 14 Tage nur die Euglobulinüberempfindlichkeit da ist, so daß man in diesem Falle praktisch genommen nur das Euglobulin des Vollserums als am anaphylaktischen Schock beteiligt ansehen kann. Was nun eine der Nutzanwendungen der von Dale und Hartley festgestellten langen Inkubationszeit des Albumins anbelangt, so könnte man die oben erwähnten Schübe von Serumexanthem einfach auf das verschiedene In-Erscheinung-treten der Überempfindlichkeit gegen die einzelnen Bestandteile des Serums beziehen (Dale und Hartley).

Die verschiedenen Ergebnisse der Arbeiten von Doerr und Ruß, Dale und Hartley, sowie die große praktische Bedeutung, welche einer Bestätigung der Behauptungen von Dale und Hartley zukommen würden, ließen es als wünschenswert erscheinen, erneut auf den ganzen Fragenkomplex einzutreten und zu versuchen, eine Klärung herbeizuführen.

Es wäre zu untersuchen, inwieweit sich Euglobulin und Albumin im aktiven und passiven anaphylaktischen Versuch unterscheiden, ferner sollte festgestellt werden, ob das Albumin überhaupt antigen wirkt oder nicht und ob die beobachteten Erscheinungen nur auf Verunreinigungen zurückzuführen sind. Auch wäre es interessant zu eruieren, ob es richtig ist, daß das Albumin eine größere Menge braucht, um gleich zu wirken wie das Euglobulin, ferner, ob bei gleicher präparierender Dosis die Albuminüberempfindlichkeit nur später eintritt und gleich stark ist, oder ob sie später eintritt und nicht die Höhe der Euglobulinüberempfindlichkeit erreicht.

Die folgenden Versuche sollten eine Aufklärung bringen darüber, ob die nach der üblichen Fraktionierungsmethode nach Hofmeister mit ⅓-, ½- und Ganzsättigung

mit Ammoniumsulfat hergestellten Fraktionen von Pferdeserum bei aktiver Präparierung von Meerschweinchen und Prüfung der erzeugten Überempfindlichkeit am ganzen Tier Unterschiede in der Größe und in der zeitlichen Entstehung von ihnen hervorgerufenen Überempfindlichkeit zeigen.

Angewandte Technik.

Das Vollserum (20 ccm) wurde in Zentrifugengläschen mit Ammoniumsulfat bis zur $\frac{1}{3}$-Sättigung versetzt, der entstehende Niederschlag: Euglobulin (Fraktion A) wurde scharf abzentrifugiert und nach vorsichtigem Abheben der völlig klaren, überstehenden Flüssigkeit (Filtrat A) in der Zentrifuge mit $\frac{1}{3}$ gesättigter Ammoniumsulfatlösung einmal gewaschen, sodann quantitativ unter Zugabe einer kleinen Menge destillierten Wassers in eine Dialysierhülse (von Schleicher & Schüll) überführt, zwei Stunden gegen Leitungswasser und dann im Eisschrank gegen destilliertes Wasser dialysiert. Die Dialyse wurde fortgesetzt, bis die Refraktion des Außenwassers (gemessen im Pulfrichschen Eintauchrefraktometer der Firma Zeiß) nur mehr $\frac{1}{10}$ Skalenteil über 15 (Refrakt. des dest. Wassers) betrug. Damit war festgestellt, daß das Ammoniumsulfat nahezu restlos herausdialysiert war. Dann wurde gegen physiologische Kochsalzlösung dialysiert und schließlich das auf diese Weise wieder aufgesalzene und gelöste Euglobulin abgehebert. Es resultierten 28,4 ccm, die durch Zusatz von 11,6 ccm physiologischer Kochsalzlösung auf 40 ccm, also auf das doppelte Ausgangsvolumen, aufgefüllt wurden. Es resultierte so eine Euglobulinlösung, die in 2 ccm so viel Euglobulin enthielt, als in 1 ccm des Ausgangsvolumens enthalten waren.

Aus der Vereinigung des Filtrats A und des zugehörigen Waschwassers resultierten 40 ccm Flüssigkeit, die mit Ammoniumsulfat auf Halbsättigung gebracht wurden. Der so entstehende Pseudoglobulinniederschlag B wurde scharf abzentrifugiert.

Die überstehende Flüssigkeit C wurde quantitativ in eine Dialysierhülse überführt, wobei schließlich ein Volumen von 90 ccm resultierte, das im Vakuumexsikator bei Zimmertemperatur eingeengt und schließlich auf 40 ccm aufgefüllt wurde, so daß die Albuminlösung in bezug auf das Ausgangsvolumen dieselbe Konzentration aufwies, wie die Globulinlösungen.

Die Technik der Versuche am Meerschweinchen gestaltete sich analog der von Doerr und Ruß angegebenen Methode des quantitativen Reihenversuches mit allen dort vorgeschriebenen Kautelen.

Es wurden zunächst 4 Gruppen von Tieren mit verschiedenen Mengen von nach obigem Verfahren hergestellten Euglobulin- und Albuminlösungen präpariert. Nach Ablauf von 14, 21, 28 und 35 Tagen wurde die Überempfindlichkeit durch Reinjektion von 0,6 ccm der zur Sensibilisierung verwendeten Euglobulin- und Albuminlösungen geprüft. Der Grad der erreichten Überempfindlichkeit wurde somit nicht durch Injektion abgestufter Mengen zwecks Bestimmung der Dosis letalis minima, sondern durch die Schwere der durch eine bestimmte Dosis (0,6 ccm) ausgelösten Symptome, gemessen und nur in einzelnen Grenzfällen wurde auch die Reinjektionsdosis variiert.

Versuch 1.

Tabelle I.

Sensibilisierung und Schockauslösung

mit:

Albuminfraktion: Filtrat nach $^1/_2$-Sättg. mit $(NH_4)_2 SO_4$

Euglobulinfraktion = Niederschlag bis $^1/_3$-Sättg. mit $(NH_4)_2 SO_4$

Sensibilisierung mit:

0,02 ccm Alb. subkut. am 30. 8. 21. 0,02 ccm Euglob. subkut. am 30. 8. 11.

Reinjektionen:

Dat.	Intervall in Tagen	Reinjekt.-Dosis	Gewicht	Symptome	Reinjekt.-Dosis	Gewicht	Symptome
13. 9.	nach 14 Tg.	0,6 ccm Alb.	—	Ganz leichte, chron. Symptome. Husten. Sträubt den Pelz.	0,4 ccm Eugl.	130 g	Schwerster Schock, fällt um, erholt sich aber wieder und setzt sich auf.
					0,6 ccm Eugl.	120 g	† **in 3 Minuten**
20. 9.	nach 21 Tg.	0,7 ccm Alb.	210 g	† **in 3 Minuten**	0,6 ccm Alb.		Schwerster Schock, fällt um, schwerste Krämpfe überlebt.
27. 9.	nach 28 Tg.	0,7 ccm Alb.		Somnolenz. Protrahierter Exitus in 2 Std. Hämorrhagien in Lunge und Coecum. Wand des Coecum hochrot. Inhalt blutig.	—		—
		1,0 ccm Alb.		Protrahierte Symptome. Überlebt.	—		—

Sensibilisierung mit:

0,002 ccm Alb. subkut. am 30. 8. 21. 0,002 ccm Euglobulin am 30. 8. 21.

Reinjektionen:

Dat.	Intervall in Tagen	Reinjekt.-Dosis	Gewicht	Symptome	Reinjekt.-Dosis	Gewicht	Symptome
13. 8.	nach 14 Tg.	0,6 ccm Alb.	—	Null	0,6 ccm Eugl.	—	† **in 4 Minuten**
20. 9.	nach 21 Tg.	0,7 ccm Alb.		Protrahierte Symptome. Somnolenz. Juckreiz. Geringe Dyspnoe. Überlebt.	0,6 ccm Eugl.	245 g	† **in 3 Minuten**
					0,7 ccm Alb.	247 g	† **in 3 Minuten**
4. 10.	nach 35 Tg.	1,0 ccm Alb.		Protrahierte Symptome. Überlebt.	- -		—

Tabelle I. (Fortsetzung.)

Sensibilisierung mit:

0,0006 ccm Alb. subkut. am 30. 8. 21. 0,0006 ccm Euglob. am 30. 8. 21.

Reinjektionen:

Dat.	Intervall in Tagen	Reinjekt.-Dosis	Gewicht	Symptome	Reinjekt.-Dosis	Gewicht	Symptome
13. 9.	nach 14 Tg.	—	—	—	0,6 ccm Eugl.	—	geringe Dyspnoe. Sonst fast Null
20. 9.	nach 21 Tg.	0,7 ccm Alb.	258 g	Somnolenz, protrahierte Symptome. Überlebt.	0,6 ccm Eugl.		leichte S., Jaktat., Husten
					0,6 ccm Eugl.		leichte S., Jaktat., Husten
27. 9.	nach 28 Tg.	1,5 ccm Alb.		Somnolenz, protrahierte Symptome. Überlebt.	—		—
		2,0 ccm Alb. [1])		Sofort Husten, Dyspnoe, Jaktationen, dann protrahierte Symptome. Somnolenz.			
				† in 4 Stunden. Obdukt. Emphysem d. Lunge bei Rupe-rumsomnolenz.	—		—
4. 10.	nach 35 Tg.	1,0 ccm Alb.		fast Null.	—		—

1) Andere Alb.-Lösung Esbach 3%. War durch Ausfällen mit $(NH_4)_2SO_4$ von den nicht fällbaren Serumbestandteilen befreit.

Sensibilisierung mit:

0,0002 ccm Alb. subkut. am 30. 8. 21. 0,0002 ccm Eugl. subkut. am 30. 8. 21.

Reinjektionen:

Dat.	Intervall in Tagen	Reinjekt.-Dosis	Gewicht	Symptome	Reinjekt.-Dosis	Gewicht	Symptome
20. 9.	nach 21 Tg.	—	—	—	0,6 ccm Eugl.	215 g	s. S. agonal; erholt sich
					0,7 ccm Eugl.		**† in 3 Minuten**
4. 10.	nach 35 Tg.	1,0 ccm Alb.		fast Null		280 g	—

Im Anschluß an diese Versuchsreihe wurde ein zweiter Versuch durchgeführt, der einen noch eingehenderen Aufschluß geben sollte, ob und inwiefern die Albuminüberempfindlichkeit in zeitlicher und quantitativer Beziehung durch Variation der zur Sensibilisierung verwendeten Albuminmenge und insbesondere durch Verwendung hoher Dosen beeinflußt wird.

Versuch 2.

Tabelle II.

Sensibilisierung mit Albumin in großen Mengen:

Zur Sensibilisierung wird die gleiche Albuminlösung wie im vorstehenden Versuch, zur Schockauslösung eine andere, durch Fällung mit $(NH_4)_2 SO_4$ gereinigte Albuminlösung mit einem Gehalt von 3% Eiweiß (nach Esbach) verwendet.

Sensibilisierung subkutan am 13. 9. 1921	Reinjektion intravenös	Intervall in Tagen	Dosis	Gewicht	Dosis pro 100 g	Resultat
0,06 ccm Alb.	22. 9.	9	2,0 ccm Alb.	370 g	0,540	starke Dyspnoe
0,06 » »	22. 9.	9	2,0 » »	350 g	0,571	† **in 7 Minuten**
0,06 » »	22. 9.	9	1,0 » »	327 g	0,302	fast Null
0,06 » »	4. 10.	21	1,5 » »	360 g	0,416	fast Null, etwas Dyspnoe
0,2 » »	26. 9.	13	1,0 » »	330 g	0,303	fast Null
0,2 » »	26. 9.	13	**1,0 » Eugl.**	**397 g**	**0,251**	† **in 3 Minuten**
0,2 » »	26. 9.	13	**1,2 » Eugl.**	**385 g**	**0,311**	**fast Null**
0,2 » »	4. 10.	21	1,5 » Alb.	—	—	fast Null, etwas Dyspnoe
0,4 » »	22. 9.	9	2,0 » »	277 g	0,722	fast Null
0,4 » »	26. 9.	13	1,0 » »	288 g	0,347	» »
0,4 » »	26. 9.	13	**1,0 » Eugl.**	**322 g**	**0,310**	**fast Null**
0,4 » »	4. 10.	21	1,5 » Alb.	350 g	0,428	† **in 5 Minuten**
0,8 » »	22. 9.	9	1,0 » »	330 g	0,303	† **in 5 Minuten**
Kontrolle	26. 9.		1,0 » Eugl. i. V.	225 g	0,444	fast Null

Betrachtet man zunächst die sensibilisierende Wirkung der **Euglobulinfraktion** in obigen Versuchen, so geht daraus hervor, daß, bei präparierenden Dosen von 0,02 ccm der verwendeten Euglobulinlösung, die dem Euglobulingehalt in einer Serummenge von 0,01 ccm entsprach, und von 0,002 ccm (entsprechend 0,001 Serum) schon nach 14 Tagen und ebenso nach 21 Tagen tödlicher Schock oder schwere Symptome durch eine Reinjektionsdosis von 0,4 bis 0,6 ccm derselben Euglobulinlösung ausgelöst werden konnten, und daß nach einem Intervalle von 21 Tagen auch bei einer sensibilisierenden Dosis von 0,0002 ccm (entsprechend 0,0001 ccm Serum) analoge Symptome ausgelöst wurden, was der allgemeinen Erfahrung über die Wirksamkeit von Euglobulin und von Vollserum entspricht. Auffällig bleibt jedoch der Umstand, daß die mit der vorletzten Euglobulindosis von 0,0006 ccm sensibilisierten Tiere nach 21 Tagen nur leichte Symptome zeigten. Die durch Euglobulininjektion aktiv erzeugte Überempfindlichkeit erwies sich insofern nicht als streng gegen Euglobulin spezifisch, als in den beiden Fällen, wo den mit Euglobulin sensibilisierten Tieren Albuminlösungen reinjiziert wurden, Exitus, bzw. schwerste Symptome auftraten. Die Ursache für diese Unspezifität, die am 21. Tage, also im Maximum der Euglobulinüberempfindlichkeit erhoben wurde,

Anhang zu Tabelle II.

Von 10 mit einer nicht durch Umfällen gereinigten Pseudoalbuminlösung sensibilisierten Tieren zeigten bei Reinjektion mit einer durch zweimaliges Umfällen gereinigten Lösung:

3 Tiere † (davon 2 bei sehr hoher Dosis) = 30 %
1 Tier starke Dyspnoe . . . . . = 10 %
6 Tiere fast Null . . . . . = 60 %

Die positiven Symptome wurden beobachtet bei folgenden Zeitintervallen und schockauslösenden Volumina einer 3proz. Albuminlösung.

Symptome	Intervall	Dosis
†	von 9 Tagen	2,0 ccm Alb.
	» 9 »	1,0 » »
	» 21 »	1,5 » »
starke Dyspnoe	» 9 »	2,0 » »
fast Null	» 9 »	1,0 » »
	» 9 »	2,0 » »
	» 13 »	1,0 » »
	» 13 »	1,0 » »
	» 21 »	1,5 » »
	» 21 »	1,5 » »

Bei Reinjektion aus Euglobulin: 1 Tier †, 2 Tiere fast Null.

könnte sehr wohl in der Herstellungsart der verwendeten Albuminfraktion liegen, die auch den bei ½- bis ⅔-Sättigung ausfällbaren, dem Pseudoglobulin also noch recht nahe stehenden Eiweißanteil enthielt.

Die aktive Sensibilisierung mit **Albuminlösung** wurde in 8 Gruppen von Tieren mit verschiedenen Mengen von Albumin ausgeführt, und zwar mit 0,0002; 0,0006; 0,002; 0,02; 0,06; 0,2; 0,4; 0,8 ccm. Dabei ergab sich nun bei der kleinsten Dosis und nach 35 Tagen ein völlig negatives Resultat, während bei gleicher sensibilisierender Euglobulindosis Exitus erzielt wurde, und zwar schon bei geringerer Reinjektionsdosis. Auch bei Sensibilisierung mit der zweitniedrigsten Menge Albumin (0,0006) war die erzielte Überempfindlichkeit nur gering. Nach 21 und 28 Tagen wurden protrahierte Symptome, nach 35 Tagen ein nahezu negatives Resultat erzielt. Der Exitus nach Reinjektion von 2 ccm einer 3prozentigen Albuminlösung zeigt, daß es schon sehr hoher schockauslösender Dosen bedarf, um nach Präparierung mit kleinen Albuminmengen Exitus auszulösen. Bei Sensibilisierung mit der drittkleinsten Dosis (0,002 ccm) war nach 14 Tagen keine, nach 21 und 35 Tagen eine schwache Überempfindlichkeitsreaktion zu beobachten. Bei den höheren sensibilisierenden Dosen von 0,002 bis 0,8 ccm) war der Grad der Überempfindlichkeit sehr ungleichmäßig. Es wurden letale Reaktionen beobachtet, und zwar bereits nach 21, ja in zwei Fällen sogar nach 9 Tagen, daneben Fälle ohne anaphylaktische Reaktion.

Ein langsameres Ansteigen der Albumin-Überempfindlichkeit gegenüber der Euglobulüberempfindlichkeit geht aus den Versuchen insofern hervor, als bei kleineren präparierenden Dosen (0,02 und 0,002) gegen

Euglobulin schon in 14 Tagen eine Überempfindlichkeit mit letalem Ausgang entwickelt war, während zu dieser Zeit die entsprechenden Albumintiere noch keine oder ganz leichte Symptome aufwiesen, und erst nach 21 Tagen, aber dann deutliche, mitunter letale Symptome zeigten. Jedenfalls kann dieser Unterschied der Inkubation durch Verwendung exzessiv hoher Albumindosen ausgeglichen werden, insofern, als bei 0,06 und 0,8 ccm Albumin bereits nach 9 Tagen, allerdings nicht bei allen Tieren, Exitus und schwerste Symptome nachgewiesen wurden. Doch bleibt auch hier zu erwägen, ob nicht die dem Pseudoglobulin nahestehende Grenzfraktion des Albumins oder Verunreinigungen des verwendeten Albuminpräparates durch Spuren von Globulin eine Albuminüberempfindlichkeit vortäuschen, während das, was geprüft wurde, eine Globulinüberempfindlichkeit war. Dafür könnte auch angeführt werden, daß die Spezifität der mit der verwendeten Albuminlösung erzeugten Überempfindlichkeit bei Verwendung hoher Dosen (0,2 und 0,4 Albuminlösung) auch keine absolute war, da bei 3 daraufhin untersuchten Tieren einmal auch eine Euglobulinlösung tödlichen Schock erzielte.

Die mit Albuminlösungen erzeugten Überempfindlichkeiten finden sich im Anhang zur Tabelle II zusammengestellt.

Die Prüfung der Fähigkeit des Albuminanteiles vom Pferdeserum, das Meerschweinchen zu sensibilisieren und beim sensibilisierten Tier Schock auszulösen, ergab also, daß der verwendeten Serumfraktion (Vollserum minus Totalglobulin) eine antigene Wirkung zukommt, daß sie schwächer ist als die Euglobulinwirkung, daß sie aber durch hohe sensibilisierende Dosen in stärkerem Maße und in kürzerer Zeit erzielt werden kann, daß sie jedoch in den mitgeteilten Versuchen inkonstanter war als die Euglobulinüberempfindlichkeit.

Das in obigen Versuchen verwendete Albuminpräparat dürfte, wie bereits ausgeführt, im chemischen wie im biologischen Sinn keinen einheitlichen Eiweißkörper darstellen. Auf diese Möglichkeit weisen ja jene Versuche hin, in denen Albumintiere gegen Euglobulin oder Euglobulintiere gegen Albumin überempfindlich gefunden wurden. Es ist auch darauf zu verweisen, daß nicht reines Albumin in Kochsalzlösung, sondern Albumin gelöst in den Nichteiweißbestandteilen des Serums injiziert wurde.

Das Albuminpräparat stellte also kein einheitliches Antigen dar. In einem solchen Falle kommt die Wirkung der einzelnen differenten Antigene nicht so rein zum Ausdruck wie bei deren isolierter Anwendung, sondern es findet eine gegenseitige Beeinflussung statt, die einzelnen Antigene konkurrieren miteinander hinsichtlich Immunisierungserfolges (Benjamin und Witzinger, Julian Lewis, Doerr).

Der Einfluß, den diese beiden Momente — die Reinheit bzw. Darstellungsart der sensibilisierenden und schockauslösenden Serumeiweißfraktionen und die Konkurrenz dieser Antigene im Vollserum bzw. in unvollständig gereinigten Präparaten auf den Versuchsausfall ausüben, muß Gegenstand weiterer Untersuchungen sein, die bereits im Gange sind und die unter anderm zeigen sollen, wo bei Ammonsulfatfraktionierung der Trennungsstrich gezogen werden soll, um die aus den Arbeiten von Gay und Adler, Doerr und Ruß, Goodall und Axenow, Dale

und Hartley unzweifelhaft hervorgehenden aber noch nicht übereinstimmend und restlos aufgeklärten biologischen Spezifitäten gewisser Eiweißanteile des Blutserums am reinsten zu erhalten und sie dann quantitativ vergleichend zu analysieren.

Die mitgeteilten Versuche bilden eine Etappe im Rahmen dieser Untersuchungen und haben sich mit der antigenen Wirkung von Serumfraktionen, die nach einer der häufigst angewendeten Methoden und ohne Reinigung durch Umfällen hergestellt wurden, beschäftigt.

Literaturverzeichnis.

Burckhardt A., Arch. f. exp. Path. u. Pharm., Bd. 16, S. 322.
Breinl, Arch. f. exp. Path. u. Pharm. 1911, S. 309.
Chick H., Biochemical. Journal, Bd. 8, S. 404, 1914.
Dale und Hartley, Biochemical. Journal, Bd. 10, S. 408, 1916.
Doerr R. und Ruß, Zeitschr. f. Imm.-Forschg., Bd. II, S. 109, 1909, 1.
Doerr R. und Ruß, Zeitschr. f. Imm.-Forschg., Bd. III, S. 181, 1909, 2.
Doerr E., Weichardts Ergebnisse der Hyg. Bakteriologie. Imm.-Forschg. u. exp. Therapie, 1922.
Doerr und Berger, Der Gehalt des Blutserums an artspezifischem Eiweiß. Zeitschr. f. Hyg. u. Inf.-Krankh., Bd. 93, H. 1, 1921.
Fuld und Spiro, Zeitschr. f. physiol. Chemie, 31, 407, 1902.
Gay und Adler, Journal med. Res., Bd. 18, S. 407, 1908.
Goodall, Journal of Hygien., Bd. 7, S. 607, 1907.
Hartley, Biochem. Journal, Bd. 8, S. 541, 1914.
Hammarsten O., Lehrbuch der phys. Chemie, Jahrg. 1910, Kap. 3.
Henseval, Sur la dissémination de la serum albumine et de la serum globuline dans les solutions aqueuses Réunion soc. belge. biol. 29. mars 1919.
Hopkins und Pinkus, Journal of Physiol., Bd. 23, S. 130, 1898.
Kauder, Zur Kenntnis der Eiweißkörper des Blutserums. Arch. f. exp. Path. u. Pharm., XX., 1886.
Mörner, Zeitschr. f. phys. Chemie, Bd. 34, S. 207, 1902.
Moll L., Hofmeisters Beiträge, Bd. 4, S. 563, 1904.
Pohl, Ein neues Verfahren zur Bestimmung des Globulins im Harn und in serösen Flüssigkeiten. Arch. f. exp. Path. u. Pharm., XX, 1886.
Spiro und Porges, Hofmeisters Beitr., Bd. 3, S. 277.
Rohrer, Deutsch. Arch. f. klin. Med., Bd. 121, S. 221.